

微小 RNA-125b 及其靶基因信号素分子 4C 在乳腺癌中的表达及意义

赵遵兰¹, 卢晓辉¹, 王洋洋¹, 吴海华¹, 夏春磊², 陈素莲³, 杨清玲³, 陈昌杰³

[摘要] **目的:**探讨微小 RNA (microRNA, miR)-125b 及其靶基因信号素分子 (SEMA)4C 在乳腺癌组织 (BRCR) 及其癌旁正常组织 (NCT) 中的表达情况, 并分析其与临床病理学特征的关联性及意义。 **方法:**采用荧光定量 PCR 检测 24 例 BRCR 及其 NCT 中 miR-125b 的表达, 采用免疫组织化学方法检测 40 例 BRCR 及其 NCT 中 SEMA4C 的表达。统计分析两者表达水平与患者的年龄、组织学分级、临床分期、淋巴结转移、雌、孕激素受体和人表皮生长因子受体-2 (cerbB-2) 等临床病理学特征间的关联性。 **结果:**SEMA4C 表达在 BRCR 中高于 NCT, SEMA4C 表达在淋巴结转移和 cerbB-2 表达间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 而在患者年龄、组织学分级、肿瘤临床分期及雌、孕激素受体表达间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-125b 表达在 BRCR 中低于 NCT ($P < 0.05$), 其表达在 SEMA4C、淋巴结转移以及 cerbB-2 差异均有统计学意义 ($P = 0.034 \sim P = 0.022$)。 **结论:**在乳腺浸润性导管癌中 SEMA4C 表达升高, miR-125b 表达降低, 两者均与 cerbB-2 过表达以及淋巴结转移均有一定关系, 提示 SEMA4C 为 miR-125b 靶基因之一, miR-125b 可能是一个新的乳腺癌标志物。

[关键词] 乳腺肿瘤; 微小 RNA-125b; 信号素分子 4C

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.10.001

Expressions of microRNA-125b and semaphorin 4C in breast cancer and its significance

ZHAO Zun-lan¹, LU Xiao-hui¹, WANG Yang-yang¹, WU Hai-hua¹, XIA Chun-lei², CHEN Su-lian³, YANG Qing-ling³, CHEN Chang-jie³

(1. Department of Clinical Testing and Diagnose Experimental Center, 2. Department of Bioscience,

3. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expressions of microRNA (miR)-125b and its target gene semaphorin4C (SEMA4C) in breast cancer tissue (BRCR) and adjacent normal tissue (NCT), and analyze its correlation with clinicopathologic features and significance.

Methods: The expressions of miR-125b in 24 BRCR and NCT were detected using real-time quantitative PCR, and the expressions of SEMA4C in 40 BRCR and NCT were detected by immunohistochemistry. The relationships between the expressions of miR-125b and SEMA4C and clinico-pathological parameters including age, clinical staging, lymph node metastasis, estrogen receptor, progesterone and human epidermal growth factor receptor -2 (cerbB-2) were analyzed. **Results:** The expression of SEMA4C in BRCR was higher than that in NCT, the difference between the expression of SEMA4C and cerbB-2 in lymph node metastasis tissue was statistically significant ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). The differences of the age, histological grading, clinical staging, and estrogen and progesterone receptors were not statistically significant ($P > 0.05$). The expression of miR-125b in BRCR was lower than that in NCT ($P < 0.05$), the differences between the expression of SEMA4C and cerbB-2 in lymph node metastasis tissue were statistically significant ($P = 0.034$ to $P = 0.022$). **Conclusions:** The expressions of miR-125b and SEMA4C in breast invasive ductal carcinoma increase and decrease, respectively, which is associated with lymph node metastasis and cerbB-2 level. The SEMA4C is one target gene of miR-125b, and miR-125b may serve as a potential breast cancer marker.

[Key words] breast neoplasms; microRNA-125b; semaphorin 4C

[收稿日期] 2015-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81071848); 国家级大学生创新项目 (201310367014); 安徽省自然科学基金项目 (1508085MH159); 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2013A184); 蚌埠医学院研究生科研创新项目 (Byycx1411)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 生物科学系, 3. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽蚌埠 233030

[作者简介] 赵遵兰 (1989 -), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 陈昌杰, 博士, 硕士研究生导师, 教授。E-mail: tochenchangjie@163.com

微小 RNA (microRNA, miR) 是一类长度为 19 ~ 25 个核苷酸的短链非编码 RNA, 通过抑制或直接降解 mRNA 而调控基因的表达, 发挥癌基因或抑癌基因的作用。miR-125b 在人基因组中有两个基因位点, 分别是 11 号染色体和 21 号染色体。miR-125b 在 miR 中具有非常重要的地位, 能够参与调控细胞的增殖、分化、转移等作用。Scott 等^[1-3] 研究发现, miR-125b 在不同肿瘤中含量变化是不同的, 例如在乳腺癌中表达降低, 而在脑胶质瘤中升高; 并通过对

人乳腺癌细胞株 SKBR-3 转染 miR-125b 类似物,发现人表皮生长因子受体-2(cerbB-2)和 cerbB-3 显著下调,乳腺癌细胞的生长速度减慢,运动能力降低超过 50%,进而抑制 SKBR-3 细胞的侵袭能力。信号素分子(SEMA)4C 是信号素 semaphorin 家族成员,在多种肿瘤中表达量升高;miR-125b 在肿瘤中发挥癌基因或抑癌基因的作用主要取决于靶基因的性质。本研究基于荧光定量 PCR(qRT-PCR)和免疫组织化学(免疫组化)法,检测乳腺癌组织(BRCR)及其癌旁正常组织(NCT)中 miR-125b 与 SEMA4C 的表达,并探讨其表达与临床病理学特征的关系和意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源 标本选自蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科 2012 年 1 月至 2014 年 10 月手术治疗的 40 例乳腺浸润性导管癌的 BRCR 及其 NCT 石蜡包埋组织(NCT 距肿瘤组织边缘 ≥ 5 cm,且与肿块不在同一象限);40 例中再取 24 例对应的新鲜标本,液氮保存。患者手术前无长期服用非甾体类抗炎药物史,也无其他恶性肿瘤病史。乳腺癌患者术前检查时未发现明显的远处转移,且手术前、手术中均无内分泌或放疗化疗治疗等。

1.2 标本处理 手术中取出标本组织后用 0.9% 氯化钠注射液清洗表面血渍,并剪下其中 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小组织放于装有 RNAlater 的 2 ml 无酶冻存管中;将冻存管放入液氮灌中保存,随后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;所取标本分为两份,一份用作 qRT-PCR 检测 miR-125b 的含量,另一份行常规术后病理检查及免疫组化。

1.3 一般资料及病理学特征 乳腺癌患者均为女性,年龄 26~68 岁。所有标本的病理结果均经过蚌埠医学院第一附属医院 2 位病理医生确认。依据美国癌症联合委员会 2003 版乳腺癌 TNM 分期标准,其中 I~II 期 21 例,III~IV 期 19 例。有 3 个以上淋巴结转移 14 例,无淋巴结转移或低于 3 个淋巴结转移 26 例。病理类型均为浸润性导管癌,其中 1 例合并浸润性小叶癌。

1.4 实验材料 Trizol 试剂(Invitrogen 公司);qRT-PCR 试剂、反转录试剂盒(Genecopoeia 公司);DEPC(Sigma 公司);鼠抗人 SEMA4C 一抗(博士德公司)。

1.5 实验步骤

1.5.1 RNA 提取 取出冻存管,剪约黄豆大小的

标本至碾钵中,迅速碾磨标本组织;加入 1 ml Trizol,并将其与碾磨的组织充分混匀,并将其转移至预冷的 1.5 ml 无酶 Ep 管中,冰上放置 10 min;加入 0.2 ml 三氯甲烷剧烈振荡混匀,冰上放置 15 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 g 离心 10 min;吸取上清液至新的无酶 Ep 管中,加入与上清液相同体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,室温静置 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 g 离心 10 min,弃上清液;加入 1 ml 现配的 75% 乙醇,洗涤 RNA;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,7 500 g 离心 5 min,弃上清液;将 Ep 管倒置晾干,加入适量 DEPC 水充分溶解 RNA,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.5.2 qRT-PCR qRT-PCR 方法检测 24 例 BRCR 及其 NCT miR-125b 含量 U6 snRNA 作为内参进行归一化。以 NCT 为对照,miR-125b 在 BRCR 中的相对表达量(RQ)计算公式为: $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$,其中 $\Delta CT = C_{TmiR-125b} - C_{TU6RNA}$, $\Delta\Delta CT = (C_{TmiR-125b} - C_{TU6RNA})_{BRCR} - (C_{TmiR-125b} - C_{TU6RNA})_{NCT}$ 均值。

1.5.3 免疫组化 将石蜡包埋组织块做 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚连续石蜡切片;将石蜡切片脱腊至水化;滴加 3% H_2O_2 ,室温孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗 3 遍;修复抗原;37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育一抗 2 h;PBS 洗 3 遍;37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育二抗 1 h;PBS 洗 3 遍;DAB 显色;显微镜下观察拍照。SEMA4C 免疫组化结果判定:以细胞膜出现棕黄色颗粒为判断标准,不着色或着色阳性的细胞数 $\leq 10\%$ 记为 0 分, $> 10\%$ 为阳性,其中着色弱且不连续记为 1 分,着色中等或部分不连续记为 2 分,着色强且连续记为 3 分。0 分、1 分判定为 SEMA4C 低表达;2 分、3 分判定为 SEMA4C 高表达。

1.6 统计学方法 采用配对 t 检验、 χ^2 检验和四格表资料确切概率法。

2 结果

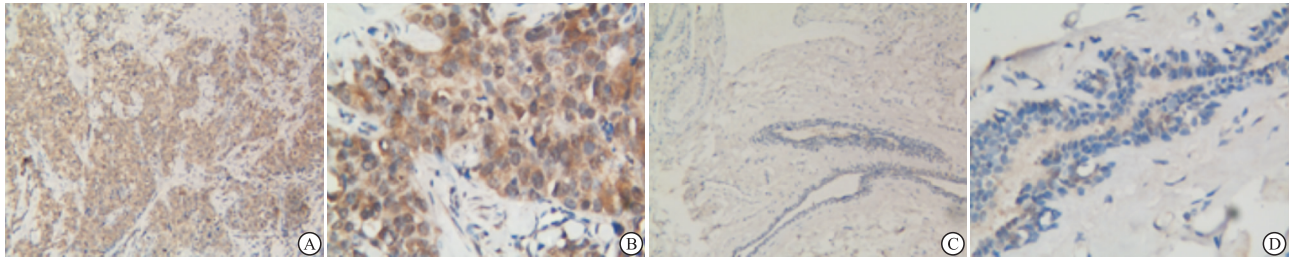
2.1 SEMA4C 在 BRCR 中的表达 取石蜡包埋的 BRCR 及其 NCT 行免疫组化法检测 SEMA4C 的表达水平。结果显示,BRCR 中 SEMA4C 表达呈强阳性,NCT 中 SEMA4C 的表达几乎为阴性(见图 1)。

2.2 乳腺浸润性导管癌患者临床病理学特征 SEMA4C 的表达在患者年龄、组织学分级、肿瘤临床分期及雌、孕激素受体表达间差异均无统计学意义($P > 0.05$);而在淋巴结转移和 cerbB-2 表达间差异均有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)(见表 1)。

2.3 BRCR 和 NCT 中 miR-125b 的表达 BRCR 和 NCT 中 miR-125b 的表达量分别为 (1.62 ± 1.74) 和

2.28 ± 1.70)。BRCR 中 miR-125b 的表达量较 NCT

降低($\bar{d} \pm s_d = -0.66 \pm 1.47, t = 2.20, P < 0.05$)。



A: BRCR(低倍镜); B: BRCR(高倍镜); C: NCT(低倍镜); D: NCT(高倍镜)

图1 免疫组化检测BRCR及其NCT中SEMA4C的表达

表1 乳腺浸润性导管癌患者临床病理学特征与 SEMA4C 表达的关系 (n)

临床病理学参数	n	SEMA4C 表达		χ^2	P
		高表达	低表达		
年龄/岁					
≤45	22	11	11	1.13	>0.05
>45	18	12	6		
组织学分级					
I ~ II	29	15	14	0.71	>0.05
III	11	8	3		
临床分期					
I ~ II	21	10	11	1.77	>0.05
III ~ IV	19	13	6		
淋巴结/个					
0 ~ 3	26	11	15	7.02	<0.01
>3	14	12	2		
雌激素受体					
-	17	11	6	0.63	>0.05
+	23	12	11		
孕酮					
-	22	13	9	0.05	>0.05
+	18	10	8		
cerbB-2					
低表达	17	6	11	5.97	<0.05
高表达	23	17	6		

表2 靶基因 SEMA4C 及乳腺浸润性导管癌患者相关临床病理学特征与 miR-125b 表达的关系 (n)

SEMA4C 表达和临床病理学特征	n	miR-125b 表达		P
		高表达	低表达	
SEMA4C				
高表达	14	2	12	0.032
低表达	10	6	4	
淋巴结/个				
0 ~ 3	13	7	6	0.034
>3	11	1	10	
cerbB-2				
高表达	15	2	13	0.022
低表达	9	6	6	

2.4 靶基因 SEMA4C 及乳腺浸润性导管癌患者相关临床病理学特征与 miR-125b 表达的关系 miR-125b、SEMA4C、cerbB-2 的表达和淋巴转移间差异均有统计学意义($P = 0.034 \sim P = 0.022$) (见表2)。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,致死率高且出现年轻化的趋势。目前在临床上乳腺癌的治疗以手术为主,放化疗为辅。但治疗效果并不理想,复发率高。因此,临床上急需新的诊断标志物和治

疗策略。miR 在肿瘤中的作用已被广泛认可,已成为探求肿瘤新标志的新方向。miR-125b 在不同的肿瘤中可能发挥着癌基因或抑癌基因的作用,其效应取决于其靶基因的性质。Chen 等^[2]研究表明,miR-125b 在脑胶质瘤细胞中表达量增高,并能通过调控 B 淋巴细胞瘤-2 激活抑制蛋白 1,增加细胞对替莫唑胺的耐药,发挥癌基因的作用。研究^[4]还发现,miR-125b 在乳腺浸润性导管癌中,通过调控 E26 转录因子 1 发挥抑癌基因的作用。目前已被证实为 miR-125b 的靶基因还有促红细胞生成素受体、cerbB-2、上皮细胞钠通道 α 亚基因、ARID 家族 3B、谷氨酰基氨基酸酶基因、小鼠表皮生长因子 9 等^[5-7],这些靶基因在一定程度上影响细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移和侵袭,因此 miR-125b 可能在肿瘤的发生、进展等各阶段中发挥多重作用。

临床上经常用肿瘤大小、淋巴结转移及其病理学特性作为判断乳腺癌预后的重要指标,而将激素受体水平作为预测患者内分泌治疗的指标。随着检测方法的不断创新,也不断涌现新的判断预后指标,其中 cerbB-2 编码人表皮生长因子,参与调控细胞增长、促进肿瘤细胞的增殖及侵袭能力,是近年来判

断乳腺癌预后的热门生物标志物,已成为临床病理学检查的常规指标。目前关于 miR-125b 在新鲜 BRCA 中表达及其与乳腺癌病理学特征之间的关系研究很少。本实验收集的 40 例标本均为乳腺浸润性导管癌,属于乳腺癌组织病理类型中预后较差的一类。因此,用乳腺浸润性导管癌组织标本对研究乳腺癌与 miR-125b 的关系,探索乳腺癌诊断新的标志分子具有更大的意义。本研究对 24 例乳腺浸润性导管癌及其 NCT 进行 miR-125b 含量检测,发现 BRCA 中 miR-125b 的含量明显低于 NCT。并且 miR-125b 在 cerbB-2 阳性、淋巴结转移的患者中表达量均低于 cerbB-2 阴性和淋巴结无转移的患者 ($P < 0.05$)。因此,本研究提示 BRCA 中 miR-125b 表达量降低可能预示着患者预后不良。miR-125b 很有可能成为判断乳腺癌预后的一个新的分子生物学指标。

SEMA4C 在肿瘤的发生发展中也发挥重要的作用。叶双梅等^[3]研究发现,在食管癌、胃癌、直肠癌中 SEMA4C 高表达,且与淋巴结转移有关。Zeng 等^[8]研究发现,SEMA4C 能够激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶,并且能够通过该途径促进转录生长因子 $\beta 1$ 介导的上皮间质转化作用。我们选取 40 例乳腺浸润性导管癌及其 NCT 的石蜡包埋切片行免疫组化检测 SEMA4C 含量,发现 BRCA 中 SEMA4C 表达呈强阳性,而相应的 NCT 中 SEMA4C 的表达几乎为阴性,表明 SEMA4C 在乳腺癌中表达升高。对其临床病理相关指标进行分析,发现 SEMA4C 的表达在淋巴转移及 cerbB-2 表达间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。淋巴高转移或 cerbB-2 阳性的患者,相对于无淋巴转移或 cerbB-2 阴性的患者,SEMA4C 的表达量高。

Scott 等^[1]在人乳腺癌细胞株 SKBR-3 中发现 cerbB-2 为 miR-125b 的靶基因之一,并利用生物信息学方法分析后得出结论,miR-125b 与 cerbB-2、cerbB-3 的 mRNA 3'-非翻译区之间存在有相互互补配对的区域,即 miR-125b 可能靶向 cerbB-2 和 cerbB-3。但是 miRNA 并不是只具有单一的靶基因,某些 miRNA 可以同时影响几个靶基因的表达。我们前期研究^[9]发现,SEMA4C 是 miR-125b 的靶基因之一,并且在调控乳腺癌细胞的上皮间质转化作

用中发挥重要作用。本研究对 24 例乳腺浸润性导管癌及其 NCT 进行 miR-125b 及 SEMA4C 的含量测定,发现差异有统计学意义 ($P = 0.032$),进一步从临床组织学上验证了在 BRCA 中 SEMA4C 是 miR-125b 的靶基因。

综上所述,在与 NCT 相比较,乳腺浸润性导管癌中 miR-125b 的含量降低,SEMA4C 的含量升高,并且均与淋巴转移和 cerbB-2 有一定关系。说明 miR-125b 在肿瘤的诊断中具有重要的意义。miR-125b 在多种肿瘤中呈现低表达或高表达,推测其在肿瘤的发生发展中具有重要的角色,因此,进一步研究 miR-125b 的作用机制对肿瘤的诊断具有重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Scott GK, Goga A, Bhaumik D, *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1479 - 1486.
- [2] Chen J, Fu X, Wan Y, *et al.* miR-125b inhibitor enhance the chemosensitivity of glioblastoma stem cells to temozolomide by targeting Bak1[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 6293 - 6302.
- [3] 叶双梅, 韩敏, 阚淳一, 等. 信号素分子 4C 在食管癌、胃癌和直肠癌中的表达及其意义[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(28): 1954 - 1958.
- [4] Zhang Y, Yan LX, Wu QN, *et al.* miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(10): 3552 - 3562.
- [5] Ferracin M, Bassi C, Pedriali M, *et al.* miR-125b targets erythropoietin and its receptor and their expression correlates with metastatic potential and ERBB2/HER2 expression [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 130.
- [6] Zhang Z, Chen J, He Y, *et al.* miR-125b inhibits hepatitis B virus expression *in vitro* through targeting of the SCNN1A gene[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3335 - 3343.
- [7] Akhavantabasi S, Sapmaz A, Tuna S, *et al.* miR-125b targets ARID3B in breast cancer cells[J]. *Cell Struct Funct*, 2012, 37(1): 27 - 38.
- [8] Zeng R, Han M, Luo Y, *et al.* Role of Sema4C in TGF- $\beta 1$ -induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(4): 1149 - 1156.
- [9] Yang Q, Wang Y, Lu X, *et al.* MiR-125b regulates epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in paclitaxel-resistant breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3268 - 3279.

(本文编辑 马启)